

Japanese Patent Office		
Classification: C12P19/32		Publication No.: 59-78697
	Publication	Publication date: May 7, 1984
(Total pages 4)		
<p>Title: Preparation of 5'-guanylic acid</p> <p>Application No.: 57-187050</p> <p>Application date: October 25, 1982</p> <p>Inventors: 1. Fujio tatsurou ; 2. Furuya akira</p> <p>Applicant: KYOWA HAKKO KOGYO KK</p> <p>Abstract:</p> <p>To obtain the titled substance efficiently, by treating 5'-xanthylic acid with a bacterium belonging to the genus <i>Brevibacterium</i> or <i>Corynebacterium</i> in an aqueous medium containing phytic acid or it and magnesium ion. A culture of a bacterium such as <i>Brevibacterium ammoniagenes</i> ATCC21170, <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC21171, etc. belonging to the genus <i>Brevibacterium</i> or <i>Corynebacterium</i>, its mold or a treated material thereof is treated with 5'-xanthylic acid, an ammonia donor, and an energy donor. In the operation, when the treatment is carried out in an aqueous medium containing a surface active agent and/or an organic solvent in the presence of phytic acid and magnesium ion, 5'-guanylic acid is obtained efficiently. The desired substance is separated and collected with an ion exchange resin or by chromatography with active carbon.</p>		

## ⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—78697

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 昭和59年(1984)5月7日  
 C 12 P 19/32 7258—4 B  
 //(C 12 P 19/32 発明の数 1  
 C 12 R 1/13 ) 6760—4 B 審査請求 未請求  
 (C 12 P 19/32  
 C 12 R 1/15 ) 6760—4 B (全 4 頁)

## ⑭ 5'-グアニル酸の製造法

⑯ 発明者 古屋晃

川崎市麻生区多摩美1—10—5

⑰ 特 願 昭57—187050

⑰ 出 願 人 協和醸酵工業株式会社

⑱ 出 願 昭57(1982)10月25日

東京都千代田区大手町1丁目6

⑲ 発 明 者 藤尾達郎

番1号

相模原市相模台6—29—1

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

5'-グアニル酸の製造法

## 2. 特許請求の範囲

プレバクテリウム属またはコリネバクテリウム属に属し、5'-キサンチル酸、アンモニア供与体およびエネルギー供与体から5'-グアニル酸を生成する能力を有する微生物の培養物、菌体またはそれらの処理物と5'-キサンチル酸、アンモニア供与体およびエネルギー供与体とを界面活性剤および／または有機溶剤を含有する水性媒体中においてフィチン酸あるいはフィチン酸とマグネシウムイオンの存在下に作用せしめて5'-グアニル酸を生成せしめ、生成した5'-グアニル酸を採取することを特徴とする5'-グアニル酸の製造法。

## 3. 発明の詳細な説明

本発明は5'-キサンチル酸(以下XMPと記す)から5'-グアニル酸(以下GMPと記す)

を製造する方法に関する。

GMPは調味料として広く用いられており、XMPから製造する方法が知られている。

本発明者らは、GMPをより効率的に製造する方法について研究した結果、水性媒体中でXMPをGMPに変換する能力を有する微生物をXMPに作用させてGMPを生成せしめるに当たり、フィチン酸単独あるいはフィチン酸とマグネシウムイオンを該水性媒体中に添加することにより、著しくGMPの収率が飛ぶることを見出した。この発明はこの知見に基づいて完成されたものである。

以下本発明を詳細に説明する。

本発明において用いる菌株は、プレバクテリウム属もしくはコリネバクテリウム属に属する微生物に紫外線、コバルト60-γ線等の照射を行うか、またはジメチルサルフェイト、亜硝酸、ニトロソグアニジン等の化学処理を行うことにより誘導された変異株があげられる。

たとえばデコイニン耐性株、サイコフラニン耐

に変換する能力を有するものであればいずれも使用可能である。またこれら生質と同時に他の栄養要求性（例えばアミノ酸類、ビタミン類、プリン類、ビリミジン類等）を示す変異株も含まれる。好適な菌株としては例えばブレヴィバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 21170 およびコリネバクテリウムグルタミクム ATCC 21171 があげられる。

微生物の培養に用いる培地組成としては、炭素源、窒素源、無機塩その他の栄養物などを含み、使用する微生物の生育を十分に支持するものであれば天然培地、人工培地いずれでも使用可能である。すなわち、炭素源としては炭水化物（グルコース、澱粉、糖蜜等）、炭化水素（ノルマルパラフィン、ケロセン等）、アルコール（メタノール、グリセリン、ソルビトール等）、有機酸（ビルビン酸、乳酸、酢酸等）、アミノ酸（グリシン、アラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸等）等が用いられる。

供与体と接触反応させてもよい。処理物としては培養物の濃縮物もしくは乾燥物、培養物を遠心分離機等で処理して得られる上清もしくは菌体、菌体の乾燥物、アセトン処理物、界面活性剤処理物、音波処理物、溶菌酵素処理物、固定化菌体あるいは菌体からの抽出酵素製品等があげられる。

アンモニア供与体としては、液体アンモニア、尿素、塩化アンモニウムなどの無機アンモニウム塩が用いられる。アンモニア供与体は 0.1 ~ 20 g/l の濃度で使用される。エネルギー供与体としてはグルコース、フラクトース、シュクロース加水分解物、糖蜜、澱粉加水分解物などの炭水化物、ビルビン酸、乳酸、酢酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸などの有機酸、グリシン、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸などのアミノ酸が用いられる。エネルギー供与体は 5 ~ 150 g/l の濃度で使用される。

接触反応は水性媒体中であればいずれでも行うことができるが、最も好的には、微生物の培

アンモニア等、無機塩としては燐酸カリ、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸鉄、塩化マンガン、硫酸亜鉛等、その他の栄養物としてはプリンおよびビリミジン系化合物および天然有機物（肉エキス、酵母エキス、ペプトン、カザミノ酸等）が使用可能である。栄養要求性を示す菌株を用いる場合はその要求を満足させる物質を培地中に存在させる。

微生物の培養条件としては、20 ~ 40℃の温度で、振盪、通気攪拌等の好氣的条件下で、アンモニア、アンモニア水、尿素、苛性カリ、苛性ソーダ等を用いて pH を中性付近に調節しながら、1 ~ 4 日間培養を行う。

かくして得られる微生物の培養物は、そのままでも水性媒体中において XMP を OMP に変換する反応に使用できる。さらに、該培養物を種々処理して得られる処理物を界面活性剤および/または有機溶剤を含有する水性媒体中において XMP、アンモニア供与体およびエネルギー

養終了後に、該培養液に XMP 等を添加して接触反応を行わせる方法があげられる。この場合培養終了時に XMP、アンモニア供与体、糖類、界面活性剤および/または有機溶剤を加え、さらに必要な場合はその他の物質を加え、好氣的条件下において 20 ~ 50℃、好ましくは 37℃ ~ 45℃ で 3 ~ 72 時間反応させることにより目的物を蓄積させることができる。その際、pH を 6 ~ 8、好ましくは 7 ~ 7.8 に調節することが望ましい。

用いる XMP は、高度に精製されたものでも、また OMP への変換に支障がなければ粗精製物、XMP の含有物、もしくは XMP 発酵で得られた XMP を含有する培養液等いずれでも使用可能である。XMP の添加量は、使用菌体標品の変換活性により異なるが、 $XMP \cdot Na_2 \cdot 7H_2O$  として 10 ~ 100 g/l が通常用いられる。

用いられる界面活性剤としては、カチオン性界面活性剤、例えばポリオキシエチレンステアリンアミン（例えばナイミーン 8-215、日本

ブロマイド、セチルピリジウムクロライド等、アニオン性界面活性剤、例えばナトリウムラウリル硫酸、ナトリウムオレイルアミド硫酸、非イオン性界面活性剤、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート（例えばノニオン ST 221、日本油脂 K.K. 製）等、両性界面活性剤、例えばラウリルベタイン（例えばアノン B F、日本油脂 K.K. 製）等があげられ、これらは通常 0.1 ~ 50 g/l、好ましくは 1 ~ 20 g/l の濃度で用いられる。

有機溶剤としては、トルエン、キシレン、脂肪族アルコール、ベンゼン、酢酸エチルなどが用いられ、その濃度は 0.1 ~ 50 ml/l、好ましくは 1 ~ 20 ml/l がよい。

フィチン酸としては、遊離の酸でも、またそのナトリウム、カリウム等の塩でも、さらにフィチン酸を高濃度に含有する天然物（例えば、フィチン、コーンステープリカー等）でも、いずれでも使用できる。その濃度はフィチン酸と

がよい。添加時期は接触反応の開始時または 12 時間目までのいずれの時期でもよく、また微生物の培養物を反応に用いる場合にはその培養中のいずれの時期でもよいが、通常は接触反応開始時に添加する。

マグネシウムイオンは硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硝酸マグネシウム、酢酸マグネシウム、乳酸マグネシウム等の無機酸および有機酸の塩のいずれでも用いられるが、通常は硫酸マグネシウムが用いられる。マグネシウムイオンの添加時期はフィチン酸の添加後ならいずれの時期でもよいが、通常はフィチン酸添加直後から 4 時間目までに添加する。添加量は通常 1 ~ 50 g/l であり、好ましくは 1 ~ 20 g/l の濃度で用いられる。

かくして水性媒体中に生成した OMP を分離・採取するに際しては、5'-プリンヌクレオチドを分離・採取する通常の手段、例えばイオン交換樹脂や活性炭によるクロマトグラフィー等の方

法を用いることができる。

以下に本発明の実施例を示す。

#### 実施例 1.

種菌としてプレバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 21170 株を用い、グルコース 7%、ペプトン 1%、酵母エキス 1%、食塩 0.3% (pH 7.2) の培地組成で、30℃で 20 時間培養したものを、発酵培地に対して 10% (容量) の割合で接種した。種培地、発酵培地とも 250 ml 容量の三角フラスコに 20 ml ずつ分注し、殺菌後使用した。発酵培地は下記の組成のものを用いた。

発酵培地組成：グルコース 10%、尿素 0.6%、(別殺菌)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.01%、ビオチン 30 μg/l、酵母エキス 0.5%、肉エキス 0.5%。

発酵培地は苛性ソーダを用いて pH 7.6 に調整し、殺菌は 120℃、10 分間加圧条件下で行った。30℃で振盪培養を行い、培養中適宜

希アンモニア水で pH を 7.0 に調節しながら 48 時間培養を行った。

培養終了液 10 ml を太型試験管に分注し、XMP、硫酸、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、グルコース、ナイミーン S-215 をそれぞれ最終濃度で 40 g/l、2 g/l、5 g/l、50 g/l、12 g/l となるように添加した。往復振盪機を用いて、好気的な条件のもとで、アンモニア水を用いて pH を 7.4 付近に調節しつつ、42℃に 12 時間保った。フィチン酸およびマグネシウムイオンを添加した場合と無添加の場合の OMP 生成量を比較した結果を第 1 表に示す。

第 1 表

添 加 物 (g/l)		OMP・ $\text{Na}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の生成量 (g/l)
フィチン酸 <sup>※</sup>	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ <sup>※※</sup>	
0	0	18.1
0	5	16.5
10	0	25.0
10	5	32.2

※ NIM S-215 添加の直前に添加。

※※ NIM S-215 添加後 2 時間目に添加。

実施例 1 と同じ菌株を、発酵培地のグルコースを 18% とした以外は同条件で培養し、該培養終了液 5 ml を分注した太型試験管に XMP 発酵培養液 (XMP·Na<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 70 g/L 含有) 5 ml とその他の必要成分を実施例 1 と同様に添加し、実施例 1 と同様に反応した結果を第 2 表に示す。

第 2 表

添 加 物		OMP·Na <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O の 生成量 (g/L)
フィチン酸 (g/L)	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L)	
0	0	15.6
10	5	30.4

#### 実施例 3.

実施例 1 と同じ菌株を用い培養条件、および反応条件で、フィチン酸およびマグネシウムイオンを種々の量添加して、生成する GMP の量を調べた。結果を第 3 表に示す。

第 4 表

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 添加時期 (時間)	OMP·Na <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O の 生成量 (g/L)
0	26.6
1	30.5
2	34.0
3	33.7
5	32.3

#### 実施例 5.

種菌としてコリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 21171 を用いた。種培地として実施例 1 に示したものを、発酵培地として下記の組成のものを、それぞれ用いた。

発酵培地組成：澱粉加水分解液 (グルコース換算 15%)、尿素 2 g/L、NH<sub>4</sub>Cl 3 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 g/L、MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 5 mg/L、コーンステープリカー 10 g/L、ペプトン 2 g/L (pH 7.6)。

添 加 物 (g/L)		OMP·Na <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O の 生成量 (g/L)
フィチン酸	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	
0	5	16.5
5	5	27.3
10	5	34.2
20	5	32.8
10	0	25.0
10	2	31.6
10	5	36.2
10	10	33.5

#### 実施例 4.

ナイミーン S-215 (10 g/L) およびキシレン (4 ml/L) を添加する直前にフィチン酸を 10 g/L 添加し、ナイミーン S-215 を添加した直後から 5 時間目までの各時期に硫酸マグネシウム (5 g/L) を添加した以外は実施例 3 と同様の条件で GMP の生成量を調べた。第 4 表にその結果を示す。

以下実施例 1 と同じ条件で培養を行い、フィチン酸添加量を 10 g/L、硫酸マグネシウム添加量を 5 g/L としたほかは実施例 1 と同じ条件で OMP·Na<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O の生成量を調べた結果、26.5 g/L 生成した。なお、フィチン酸および硫酸マグネシウム無添加の場合の生成量は 13.2 g/L であった。

特許出願人 (102) 協和醸酵工業株式会社

代表者 木下 祝 郎